

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.03.015

疏肝健脾活血方对肝星状细胞/肝窦内皮细胞共培养体系中 VEGF/VEGFR 表达的影响

鲁军, 周凝, 黄桢, 夏雪皎, 张俊杰*

(浙江中医药大学基础医学院, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053)

摘要 目的 探讨疏肝健脾活血方逆转肝纤维化进程中肝窦毛细血管化的可能作用机制。方法 分离正常大鼠肝星状细胞 (HSC)、肝窦内皮细胞 (LSEC) 和肝纤维化模型大鼠 LSEC, 利用慢病毒转染得到血管内皮生长因子 (VEGF) 过表达 HSC。实验分为 6 组, 1) 正常 HSC 组: 正常大鼠 HSC 空白血清培养; 2) 正常组: 正常大鼠 HSC 及正常 LSEC 空白血清共培养; 3) 模型组: 正常大鼠 HSC 及模型大鼠 LSEC 空白血清共培养; 4) 过表达组: VEGF 过表达 HSC 及模型大鼠 LSEC 空白血清共培养; 5) 模型加中药组: 正常大鼠 HSC 及模型大鼠 LSEC 10% 含药血清共培养; 6) 过表达加中药组: VEGF 过表达 HSC 及模型大鼠 LSEC 10% 含药血清共培养。采用 Western Blot 法检测各组 LSEC 中血小板内皮细胞黏附因子 CD31 及血友病因子 (vWF) 蛋白表达, HSC 中胶原 IV、VEGF 及血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2) 蛋白表达; 采用 PCR 法检测各组 HSC 中 VEGF、血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR-1) 及 VEGFR-2 mRNA 表达。结果 与正常组比较, 模型组及过表达组 CD31 及 vWF 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 而模型加中药组较模型组 CD31 及 vWF 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与正常 HSC 组和正常组比较, 模型组及过表达组中胶原 IV、VEGF 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 而模型加中药组较模型组 VEGF、VEGFR-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与正常 HSC 组和正常组比较, 模型组及过表达组 VEGF mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 模型加中药组 VEGF mRNA 表达较模型组降低 ($P < 0.05$)。结论 疏肝健脾活血方可能通过下调 VEGF、VEGFR-2 蛋白表达, 进而抑制 VEGF 信号通路, 恢复 LSEC 窗孔结构, 从而逆转肝窦毛细血管化。

关键词 肝纤维化; 疏肝健脾活血方; 肝窦毛细血管化; 肝窦内皮细胞; 肝星状细胞; 血管内皮生长因子

肝纤维化是一种组织病理学概念, 以肝内各种胶原弥漫性过度沉积、基底膜网状支架破坏和肝窦毛细血管化为主要表现^[1]。肝窦毛细血管化指肝损伤发生后肝窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cell, LSEC) 失去原有窗孔结构、肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化分泌相关胶原并沉积形成内皮下基底膜, 形似连续毛细血管的过程, 是肝纤维化时结构的上表现^[2]。近年研究认为, 肝窦毛细血管化与肝纤维化的形成相互需求、相互促进^[3-4], 因此通过抑制肝窦毛细血管化减缓或逆转肝纤维化的进程成为新的治疗靶点。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factors, VEGFs) 是目前已知的功能最强的血管生成促进因子, 对 HSC 的活化和 LSEC 特有窗孔结构的保持皆

有关键作用^[5-8]。本课题组前期研究发现, 疏肝健脾活血方具有保护肝细胞、减轻肝细胞炎症反应的抗肝纤维化作用^[9]。本研究基于肝纤维化病理性血管新生病理, 以 VEGF 为靶点, 以原代分离的 HSC 与 LSEC 共培养为实验材料, 探讨疏肝健脾活血方抑制肝窦毛细血管化的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞及病毒

30 只清洁级雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 购自浙江中医药大学实验动物中心, 实验动物许可证号码: SCXK (沪) 2013-0016。293T 细胞, 购自上海中国科学院细胞库。含重组 pcDNA3.1-VEGF165 的慢病毒, 汉尹生物科技 (上海) 有限公司。

1.2 药物

疏肝健脾活血方组成: 桃仁 15 g, 桂枝 10 g,

基金项目: 国家自然科学基金 (81473647)

* 通讯作者: zhangjunjie70@aliyun.com, (0571) 86633105

酒大黄 6 g, 甘草 8 g, 香附 10 g, 白术 10 g, 莪术 10 g, 鳖甲 15 g, 三七 3 g, 茯苓 15 g, 丹参 30 g, 大枣 30 g。水煎 2 次, 合并药液过滤浓缩至 2.7 g/ml (成人每日临床用药剂量的 10 倍), 4℃ 保存备用。

1.3 主要试剂与仪器

胶原酶 IV (Sigma, 批号: 20170611); I 型 DNA 酶 (Thermo Scientific, 批号: 20170401001); Nycodenz 粉剂 (Axis-Shield, 批号: 20170305); PHY-028 慢病毒载体 [汉尹生物科技(上海)有限公司]; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio, 批号: 20170502); 彩虹光谱蛋白 Marker (Solarbio, 批号: 20170511); 胶原 IV 兔抗大鼠多克隆抗体 (Proteintech, 批号: NM-000495); 血管内皮生长因子 (VEGF) 兔抗大鼠多克隆抗体 (Abcam, 批号: GR3173818-1); 血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2) 兔抗大鼠多克隆抗体 (Proteintech, 批号: BC039008); CD31 兔抗大鼠多克隆抗体 (Cell Signaling Technology, 批号: 04/2017); Opti-MEM (Thermo Fisher Science, 批号: 171114); Lenti-v (江苏吉锐生物技术有限公司, 批号: 171126); PA (上海汉尹生物科技有限公司, 批号: HY-P-051); PB (上海汉尹生物科技有限公司, 批号: HY-P-043); Polyethylenimine (Liner, 货号: MW-25000); Enhancing buffer (上海汉尹生物科技有限公司, 批号: HY-P-101); ECL 发光试剂盒 (Solarbio, 批号: 20170613); 血友病因子 (vWF) 兔抗大鼠多克隆抗体 (Cell Signaling Technology, 批号: 06/2017); GAPDH (Abcam, 批号: GR290250-1); 超纯 RNA 提取试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司, 批号: 20170903); DMEM/F12 培养基 (Gibco, 批号: 8116105); 澳洲胎牛血清 FBS (Gibco, 批号: 1414426); 四氯化碳 (Adamas Reagent, 批号: P1203309)。

倒置显微镜 (型号: DS-Ri2, Nikon); 细胞培养箱 (型号: BC-J160S, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂); Transwell 半透膜 (货号: 3450-Clear, Costar); 凝胶成像仪 (型号: GL-3120, 海口市其林贝尔仪器制造有限公司); 荧光显微镜 (型号: BX5, 奥林巴斯公司); 离心超滤装置 (型号: UFC30GV0S, MILLIPORE); 蛋白电泳及转膜设备 (型号: MP-3030, 北京凯元信瑞仪器有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: Applied Biosystems ViiA 7, Thermo Fisher Scientific)。

1.4 疏肝健脾活血方含药血清制备

20 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 用疏肝健脾活血方按 10 ml/kg 进行灌胃, 每天 1 次, 连续 3 天, 末次给药禁食不禁水 12 h 后, 无菌条件下腹主动脉采血, 采集的血液静置 4 h 后 4℃、3000 r/min 离心 20 min, 分离得到的血清 56℃ 水浴中灭活 30 min, 取 0.22 μm 微孔滤膜过滤收集得到疏肝健脾活血方含药血清, 配置为 10% 含药血清浓度的培养基, 4℃ 保存备用。

1.5 肝纤维化大鼠 LSEC 分离及正常大鼠 HSC、LSEC 分离

10 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常组及模型组, 每组 5 只。模型组参照文献 [10] 制备肝纤维化模型, 予以皮下注射四氯化碳 (浓度为 40%, 按 2:3 比例与花生油配制), 首次剂量为 0.4 ml/100 g, 以后剂量为 0.3 ml/100 g, 每隔 4 天注射 1 次。正常组皮下注射生理盐水用法用量同模型组干预 4 周后, 应用两部灌注结合梯度密度离心法 [11] 分离所需细胞, 正常组分离 HSC 和 LSEC, 模型组仅分离 LSEC。

1.6 慢病毒转染 HSC 过表达 VEGF

慢病毒植入基因 VEGF165, 合成 oligo 二聚体 (寡聚单链 DNA 序列 5' to 3', 上游: CTACCG-GACTCAGATCTCGAGGCCACCATGAACCTTCTGCTG-TCTTGGGTGC, 下游: CGCGTGTGCGACTGCAGAAT-TCTCACTTGTGTCATCGTCTTGTAGTCCCGCCTCG-GCTTGTACATCTG), 引物由生工生物工程(上海)有限公司进行合成, 稀释合成引物终浓度为 10 μmol/L 的储藏液。目的基因片段 VEGF165 扩增及酶切后回收并测定浓度得到目的基因片段 (带绿色荧光标记), 双酶切 PHY-028 慢病毒载体并回收目的片段得到载体片段, 按载体: 目的片段 = 1:7 的摩尔比例计算体积比进行连接, 小量摇菌培养, 每个克隆挑选两个送通用生物有限公司进行测序鉴定, 确定含重组 pcDNA3.1-VEGF165 的慢病毒载体构建成功。

取 293T 细胞培养至 1×10^6 /ml 传代到 10 cm 培养皿中, 细胞长至 80% ~ 90% 时准备转染。取无菌 1.5 ml EP 管, 转染体系如下: Opti-MEM 1 ml、Lenti-v 15 μg、PA 3 μg、PB 9 μg、Polyethylenimine (1 mg/ml) 67.5 μl, 混匀, 室温放置 20 min 后, 均匀滴加到换液后的培养皿中, 置于培养箱中培 12 h, 均匀滴加 100 × Enhancing buffer 促转染。转染 18 ~ 20 h 后换 15 ml 细胞培养基 (含

2% 胎牛血清的 DMEM) 继续培养, 48 h 后取上清液 4℃、5000 r/min 离心 5 min, 0.45 μm 滤器过滤后分批移至离心超滤装置, 4℃、5000 r/min 离心 10 min, 弃下层液体, 再次 4℃、5000 r/min, 离心 20 min, 滤器上层中液体即为病毒浓缩液, 收集以 50 μl 分装, 保存于 -80℃。以合适的浓度 (按原代大鼠 HSC 增殖速度, 细胞密度以培养 12~24 h 后细胞的贴壁率达 30%~50% 为宜) 将原代大鼠 HSC 接种于 6 孔板中, 细胞贴壁率达 30%~50% 时, 按 1×10^8 滴度的病毒 10 μl 加 1 ml 的感染用培养基的比例进行感染, 37℃ 5% CO₂ 培养, 12 h 完成感染得到 VEGF 过表达 HSC。

1.7 细胞分组及处理

将分离得到的正常大鼠 HSC 和 LSEC、肝纤维化模型大鼠 LSEC、VEGF 过表达 HSC 分为如下 6 个组。正常 HSC 组: 正常大鼠 HSC 空白血清培养; 正常组: 正常大鼠 HSC 及正常 LSEC 空白血清共培养; 模型组: 正常大鼠 HSC 及模型大鼠 LSEC 空白血清共培养; 过表达组: VEGF 过表达 HSC 及模型大鼠 LSEC 空白血清共培养; 模型加中药组: 正常大鼠 HSC 及模型大鼠 LSEC 10% 含药血清共培养; 过表达加中药组: VEGF 过表达 HSC 及模型大鼠 LSEC 10% 含药血清共培养。调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 利用 Transwell 半透膜将两种细胞分组接种至 6 孔板: 下层 3×10^5 个细胞 (HSC), 上层 2×10^5 个细胞 (LSEC), 含药血清组以 10% 含药血清 0.5 ml 培养。

1.8 观察指标及方法

1.8.1 各组 LSEC 中 CD31、vWF 蛋白表达及 HSC 中胶原 IV、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达 采用免疫印迹 (Western Blot) 法检测, 分别收集 LSEC 及 HSC 于 1.5 ml 离心管中, 每组 3 个样本。加入细胞裂解液裂解细胞后 4℃、12000 r/min 离心 10 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度 (BCA 标准品终浓度为 0.5 mg/ml), 按每个样品含 15 μg 蛋白的溶液体积与预染 Marker 5 μl 比例行 SDS-PAGE 电泳, 蛋白分离后转膜封闭 2 h, 漂洗后用相应稀释一抗 (1:200) 4℃ 孵育过夜, 漂洗后用稀释二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, 漂洗后用 ECL 发光试剂盒在暗室中显影、定影、洗片, 胶片扫描拍照分析条带灰度值。结果用目标蛋白灰度值与内参蛋白 (GAPDH) 灰度值的比值表示相对表达量。

1.8.2 各组 HSC 中 VEGF 及 VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 表达 采用实时荧光定量聚合酶链式反应

(QRT-PCR) 检测, PCR 引物序列及扩增片段长度见表 1, 赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司合成。收集 HSC, 按 RNA 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取, 提取结束进行反转录操作, 反转录所获得的 cDNA 用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增, 扩增反应条件如下: 预变性: 95℃ 5 min; 40 个循环 (95℃ 15 s, 60℃ 30 s); 溶解曲线: 从 60℃ 开始, 每秒升高 0.05℃, 直到 95℃, 循环 1 次。所有反应信息资料由 PCR 仪收集, 得到每个样本的 Ct 值, 以正常 HSC 组为对照, 以 β-actin 为内参基因, 计算每个样本的目的基因的相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。 $\Delta\Delta Ct = (\text{待测组目的基因 Ct 值} - \text{待测组内参基因 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因 Ct 值} - \text{对照组内参基因 Ct 值})$ 。重复实验 3 次。

表 1 PCR 引物序列及扩增片段长度

引物名称	序列 (5'→3')	扩增片段长度
β-actin 上游	GGCCGTCTTCCCTCCATCGT	140bp
下游	TGCCGTGTTCATGGGGTACTTCA	
VEGF 上游	CGCGGGATTGCACGGAACTT	176bp
下游	GGCCCCCTCTCTCTTCTTCTC	
VEGFR-1 上游	TGCGCGGAGAGACTTAACTAGG	135bp
下游	GCCCCCTCTTTCAACATCTTCACA	
VEGFR-2 上游	GCCGGCATGCTCTTCTGTGAG	108bp
下游	GGGGCTCAGGACCACATCATAA	

注: VEGF, 血管内皮生长因子; VEGFR-1, 血管内皮生长因子受体 1; VEGFR-2, 血管内皮生长因子受体 2

1.9 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本间的均数比较采用单因素方差分析, 两两比较方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett T^3 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 慢病毒未转染 HSC 与转染后 HSC 中 VEGF 蛋白表达比较

慢病毒未转染 HSC 中 VEGF 蛋白相对表达量为 (0.80 ± 0.01) , 转染后 HSC 中 VEGF 表达为 (1.30 ± 0.01) , 慢病毒成功转入 HSC 后细胞 VEGF 相对表达量升高 ($P < 0.05$), 提示 HSC 已成功过表达 VEGF。

2.2 各组 LSEC 中 CD31、vWF 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组及过表达组 CD31 和 vWF 表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 模型加中药组 CD31 和 vWF 表达降低 ($P <$

0.01), 过表达组 vWF 表达升高 ($P < 0.01$); 与过表达组比较, 过表达加中药组 CD31、vWF 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型加中药组比较, 过表达加中药组 CD31 和 vWF 表达均升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组肝窦内皮细胞中 CD31 及 vWF 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CD31	vWF
正常组	3	0.18 ± 0.00	0.98 ± 0.01
模型组	3	0.27 ± 0.00*	1.13 ± 0.01*
过表达组	3	0.27 ± 0.00*	1.38 ± 0.00* [△]
模型加中药组	3	0.20 ± 0.00 [△]	0.97 ± 0.02 [△]
过表达加中药组	3	0.24 ± 0.01 [▲] #	1.23 ± 0.04 [▲] #

注: vWF, 血友病因子; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与过表达组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$; 与模型加中药组比较, # $P < 0.01$

2.3 各组 HSC 中胶原 IV、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达比较

表 3 示, 与正常 HSC 组比较, 正常组胶原 IV 和 VEGF 表达降低 ($P < 0.05$), 模型组及过表达组胶原 IV、VEGF 和 VEGFR-2 表达升高 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组及过表达组胶原 IV 和 VEGF 表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 过表达组胶原 IV 和模型加中药组胶原 IV、VEGF、VEGFR-2 表达降低 ($P < 0.05$); 与过表达组比较, 过表达加中药组 VEGF 和 VEGFR-2 表达降低 ($P < 0.05$)。

表 3 各组肝星状细胞中胶原 IV、VEGF、VEGFR-2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	胶原 IV	VEGF	VEGFR-2
正常 HSC 组	3	0.63 ± 0.01	1.15 ± 0.02	1.16 ± 0.01
正常组	3	0.52 ± 0.00*	0.75 ± 0.02*	1.67 ± 0.18
模型组	3	1.08 ± 0.01* [△]	1.38 ± 0.02* [△]	1.53 ± 0.03*
过表达组	3	0.89 ± 0.04* [△] [▲]	1.39 ± 0.12* [△]	1.63 ± 0.05*
模型加中药组	3	0.82 ± 0.01 [▲]	1.00 ± 0.04 [▲]	1.11 ± 0.04 [▲]
过表达加中药组	3	0.83 ± 0.02	1.14 ± 0.03 [#]	1.40 ± 0.03 [#]

注: VEGF, 血管内皮生长因子; VEGFR-2, 血管内皮生长因子受体 2; 与正常 HSC 组比较, * $P < 0.05$; 与正常组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与过表达组比较, # $P < 0.05$

2.4 各组 HSC 中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 表达比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组 VEGF 表达升高, VEGFR-2 表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 过表达组 VEGF 表达升高 ($P < 0.01$), 模型加中药组 VEGF 表达降低 ($P < 0.01$); 与过表达组比

较, 过表达加中药组 VEGFR-2 表达升高 ($P < 0.01$); 与模型加中药组比较, 过表达加中药组 VEGF 表达升高 ($P < 0.01$)。

表 4 各组肝星状细胞中 VEGF、VEGFR-1 及 VEGFR-2 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2
正常组	3	1.20 ± 0.14	1.02 ± 0.18	1.42 ± 0.13
模型组	3	2.28 ± 0.35*	0.79 ± 0.06	0.85 ± 0.06*
过表达组	3	9.07 ± 0.27 [△]	1.26 ± 0.66	0.87 ± 0.13
模型加中药组	3	1.05 ± 0.08 [△]	0.78 ± 0.15	1.35 ± 0.59
过表达加中药组	3	10.23 ± 0.74 [#]	0.76 ± 0.08	1.25 ± 0.06 [▲]

注: VEGF, 血管内皮生长因子; VEGFR-1, 血管内皮生长因子受体 1; VEGFR-2, 血管内皮生长因子受体 2; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与过表达组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型加中药组比较, # $P < 0.01$

3 讨论

目前研究认为, HSC 是肝纤维化形成和逆转的中心环节^[1]。肝细胞受损后, 引起多种细胞因子分泌, 并激活 HSC, HSC 活化后分泌大量细胞外基质 (ECM)^[2]。ECM 过度沉积引起肝内各种胶原弥漫性沉积、基底膜网状支架破坏和肝窦毛细血管化, 导致肝纤维化的形成和发展^[3]。肝纤维化形成过程中, 沉积的胶原主要包括 I、II、IV 型, HSC 以合成 I 型为主, LSEC 主要合成 IV 型。IV 型胶原沉积可见于肝纤维化早期, 这一病理改变可启动肝纤维化相关细胞因子, 导致肝纤维化的进一步发展^[3]。而正常分化的 LSEC 能够防止 HSC 的活化及促使活化的 HSC 逆转至静止状态, 但当 LSEC 去分化或发生毛细血管瘤化后这种能力便丧失^[4]。由此可见, HSC 静息状态的维持与 LSEC 密切相关。研究发现, 正常的 LSEC 表面有窗孔, 内皮下缺乏基底膜, 是肝细胞与肝窦血液间物质交换的重要通道。LSEC 正常情况下处于静息状态。但在肝纤维化形成过程中, 由于相应免疫机制的激活, LSEC 会转为活化状态, 并发生结构变化^[3]。正常的 LSEC 在胚胎发育早期便失去了连续性内皮标志物, 如血小板内皮细胞黏附因子 CD31、第八因子相关抗原——血小板血管性 vWF。而 LSEC 失去窗孔后, CD31、vWF 等普通血管内皮细胞标志物可重新表达^[3]。

研究发现, VEGF 对肝窦毛细血管瘤化的发生亦有重要意义^[5]。从分子生物学角度来看, 肝组织血管新生是由局部缺氧所致^[6]。细胞缺氧时会引起缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 的释放, 进而促进

VEGF 基因转录^[7], 加速 VEGF 的分泌。大量分泌的 VEGF 与 VEGFR-1/VEGFR-2 结合, 激活 VEGF 信号通路, 通过丝裂原活化蛋白激酶/胞外信号调节激酶信号途径^[8], 促进内皮细胞的增殖和血管新生, 加速肝窦毛细血管化的形成和肝纤维化的恶化。而 VEGFR-2 是 VEGF 信号通路的主要传导受体^[9]。

疏肝健脾活血方由《伤寒论》中的桃核承气汤化裁而成。方中以鳖甲软坚散结、桃仁活血化瘀为君; 配伍酒大黄、莪术、丹参、三七针对血瘀病机加强君药活血化瘀之效; 佐以白术、茯苓、大枣健脾化湿, 先安未受邪之地, 兼取桂枝温通经脉、调和阴阳, 合用香附理气、气行瘀散; 最后投以甘草为使, 调和诸药, 全方配伍合理, 化瘀而不伤正, 终使气行瘀去, 癥积得消。

本研究结果发现, 不论 VEGF 过表达与否, 疏肝健脾活血方含药血清均可下调 CD31 和 vWF, 逆转 LSEC 的失窗孔化; 也能下调胶原 IV 的表达, 阻止肝窦毛细血管化的进一步加重, 延缓肝纤维化的进程。同时实验结果也表明, 不论是否过表达 VEGF, 疏肝健脾活血方含药血清均可下调 VEGF 及 VEGFR-2 蛋白表达量, 阻碍 VEGF 信号通路的激活, 从而抑制血管新生, 改善局部组织的缺氧情况。另外, 研究还发现, 在含有疏肝健脾活血方含药血清的情况下, 慢病毒转染 VEGF 仍然能上调 VEGF mRNA, 升高 CD31 和 vWF 蛋白表达, 促使肝窦毛细血管化的进一步发展。

综上, 在四氯化碳诱导的肝纤维化 SD 大鼠模型中, 慢病毒转染 VEGF 过表达能促使 LSEC 出现失窗孔化, 促进肝窦毛细血管化的发生。而疏肝健脾活血方能够逆转肝纤维化进程中 LSEC 的失窗孔化, 其机制可能与下调 VEGF 表达及促进胶原 IV、VEGFR-2 蛋白降解, 进而抑制 VEGF 信号通路有关。同时, 本实验中与模型组比较, 过表达 VEGF 刺激下 CD31 蛋白表达降低、胶原 IV 蛋白表达降低等的相关机制有待进一步探讨。本实验采用慢病毒转染过表达 VEGF 的方法, 虽观察到了 VEGF 过表达后对共培养体系中各项指标的影响, 但具体机制不明, 须进一步完善检测指标。

参考文献

- [1] OLSEN BR. Life without perlecan has its problems [J]. J Cell Biol, 1999, 147(5): 909-912.
- [2] 李军祥, 陈詒, 姚树坤. 肝纤维化中西医结合诊疗共识意见(2017 年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25

(12): 895-900.

- [3] 黄月红, 郭杞兰. 四氯化碳诱导肝纤维化早期大鼠肝窦内皮细胞及基底膜形态改变的动态研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1501-1505, 1531.
- [4] LEMOS QT, ANDRADE ZA. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010, 105(5): 611-614.
- [5] CHAMORRO-JORGANES A, LEE MY, ARALDI E, et al. VEGF-induced expression of miR-17-92 cluster in endothelial cells is mediated by ERK/ELK1 activation and regulates angiogenesis [J]. Circ Res, 2016, 118(1): 38-47.
- [6] LIU Y, LUI EL, FRIEDMAN SL, et al. PTK787/ZK22258 attenuates stellate cell activation and hepatic fibrosis in vivo by inhibiting VEGF signaling [J]. Lab Invest, 2009, 89(2): 209-221.
- [7] COULOUARN C, CORLU A, GLAISE D, et al. Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2012, 72(10): 2533-2542.
- [8] FORD AJ, JAIN G, RAJAGOPALAN P, et al. Designing a fibrotic microenvironment to investigate changes in human liver sinusoidal endothelial cell function [J]. Acta Biomater, 2015, 24: 220-227. doi: 10.1016/j.actbio.2015.06.028.
- [9] 周凝, 杨欣, 夏雪皎, 等. 疏肝健脾活血方对大鼠肝星状细胞 TGF-β1/Smads 信号通路的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(4): 267-270.
- [10] 杨开选, 程薇波, 王文冬, 等. 40% 四氯化碳大鼠慢性肝损伤模型的研究 [J]. 现代预防医学, 2005, 32(1): 20-21, 40.
- [11] 李洋, 蔡双明, 张莉莉, 等. 大鼠原代肝细胞、星状细胞、枯否细胞和肝窦内皮细胞的同步分离与培养 [J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(4): 532-537.
- [12] VALFREDI BONZO L, NOVO E, CANNITO S, et al. Angiogenesis and liver fibrogenesis [J]. Histol Histopathol, 2009, 24(10): 1323-1341.
- [13] 郭梅兰, 王小众. 肝窦内皮细胞在肝纤维化形成中的作用 [J]. 肝脏, 2013, 18(4): 269-273.
- [14] XIE G, WANG X, WANG L, et al. Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in Rats [J]. Gastroenterology, 2012, 142(4): 918-927.
- [15] THABUT D, SHAH V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: New targets for the treatment of portal hypertension? [J]. J Hepatol, 2010, 53(5): 976-980.
- [16] 吕靖, 陆雄, 陶艳艳, 等. 肝纤维化小鼠肝组织血管新生

特点及其形成机制 [J]. 肝脏, 2011, 16(1): 35-40.

- [17] SCHACHTNER H, CALAMINS SDJ, THOMAS SG. Podosomes in adhesion, migration, mechanosensing and matrix remodeling [J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2013,

70(10): 572-589.

- [18] 原雪, 郭青龙. VEGF 通路和 Notch 通路在肿瘤血管生成中的相互作用及靶向药物的研发 [J]. 药学进展, 2009, 33(5): 199-203.

Effects of *Shugan Jianpi Huoxue Decoction* (疏肝健脾活血方) on Expression of VEGF/VEGFR in Hepatic Stellate Cells/Liver Sinusoidal Endothelial Cell Co-Culture System

LU Jun, ZHOU Ning, HUANG Yan, XIA Xuejiao, ZHANG Junjie

(Basic Medical School, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Shugan Jianpi Huoxue Decoction* (疏肝健脾活血方) in treating liver sinus capillarification in liver fibrosis. **Methods** The hepatic stellate cells (HSC) and liver sinusoidal endothelial cell (LSEC) from normal rats, LSEC from liver fibrosis model rats were separated. The vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpressed HSC was obtained by virus transfection. The cells were divided into six groups: a) normal HSC group, cultured HSC by blank serum; b) normal group: co-culture normal HSC and normal LSEC by blank serum; c) model group: co-culture normal HSC and model LSEC by blank serum; d) overexpression group: co-culture VEGF overexpressed HSC and model LSEC by blank serum; e) model with herbs group: co-culture normal HSC and model LSEC by 10% drug containing serum; f) overexpression with herbs group: co-culture VEGF overexpressed HSC and model LSEC by 10% drug containing serum. Western Blot method was used to detect the expression of CD31 and von Willebrand factor (vWF) in LSEC and the expression of collagen IV, VEGF and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) in HSC. The expression of VEGF, vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1) and VEGFR-2 mRNA in HSC was detected by PCR. **Results** Compared with normal group, the expression of CD31 and vWF in model group and overexpression group was increased ($P < 0.01$), and the expression of CD31 and vWF in the model with herbs group was decreased when compared with model group ($P < 0.01$). Compared with normal HSC group and normal group, the expression of collagen IV and VEGF in model group and overexpression group was increased ($P < 0.01$), and the expression of VEGF and VEGFR-2 in the model with herbs group was decreased when compared with model group ($P < 0.05$). Compared with normal HSC group and normal group, the expression of VEGF mRNA in model group and overexpression group was increased ($P < 0.01$). The expression of VEGF mRNA in model with herbs group was decreased than that in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Shugan Jianpi Huoxue Decoction* reverse the capillary vascularization of hepatic sinus possibly by down-regulating the expression of VEGF and VEGFR-2, inhibiting the signal pathway of VEGF and restoring the window structure of LSEC.

Keywords hepatic fibrosis; *Shugan Jianpi Huoxue Decoction*; hepatic sinus capillarization; liver sinus endothelial cells (LSEC); hepatic stellate cell (HSC); vascular endothelial growth factor (VEGF)

(收稿日期: 2018-0-; 修回日期: 2018-11-12)

编辑: 王利芬

欢迎访问《中医杂志》微信小店

为了方便读者购买《中医杂志》期刊、光盘、合订本,我们特地开设了微信小店。手机操作即可查询、购买。

请扫描二维码直接访问《中医杂志》官方微信小店。

